



Petrifilm™

Environmental Listeria Plate

ペトリフィルム™ リステリア環境微生物測定用プレート

この解説書は3M ペトリフィルム™ リステリア環境測定用プレート (ELプレート) の判定をよりよく理解していただくためのものです。

詳しくは、スリーエム ヘルスケア株式会社にお問い合わせください。

ELプレートは、選択成分、栄養、冷水可溶性ゲル化剤を含む出来あがり培地です。プレートに含まれる指示薬でコロニーの識別を容易にします。ペトリフィルム™ ELプレートは環境中のリステリア菌の測定に使用します。

ペトリフィルム™ ELプレートはリステリア菌 (*Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*) を検出します。リステリア菌の各種を区別して検出することはできません。

環境中の多くの菌は環境状況下や消毒剤でストレスを受けています。緩衝ペプトン水は菌を回復させる培地としてペトリフィルム™ ELプレートと共に使用します。それらは、あらかじめお客様がご用意いただくか、滅菌済みの製品をご購入下さい。

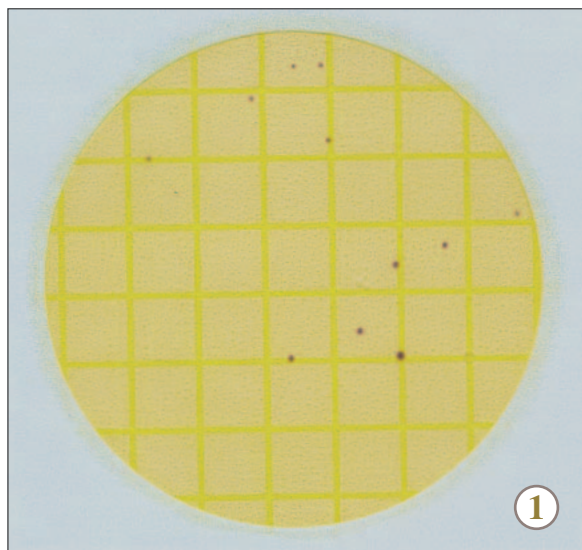
緩衝ペプトン水で菌を回復させる事は増菌とは異なります。

ELプレートは定性試験、概算試験、定量試験に使用できます。

定性試験：色の濃淡にかかわらず赤紫色のコロニーが検出されたか（陽性）、検出されなかったか（陰性）で結果を判定します。

概算試験：色の濃淡にかかわらず、現れた赤紫色のコロニーが相対的に多数・中程度・少数、として結果を判定します。多数・中程度・少数という判定は、サンプルの場所や個々の工場の基準で判断します。

定量試験：色の濃淡にかかわらず全ての赤紫色のコロニーを数えてください。フォームダム上には選択物質が無いため、フォームダム上に成育したコロニーは測定しないで下さい。



定性試験：リステリア菌陽性

概算試験：貴社の判断基準に従って、レベルを記録します。
(例: 高い、中程度など)

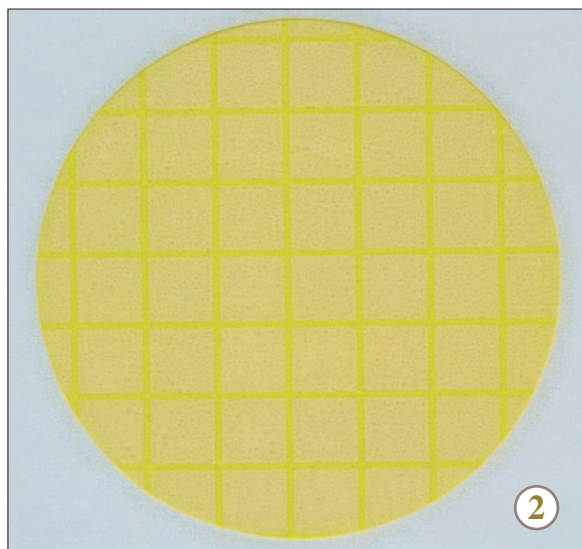
定量試験：リステリア菌のコロニー数=11CFU

写真①は典型的なリステリア菌のコロニーが出現したELプレートです。
全ての赤紫色のコロニーをカウントします。

ELプレートを最長の培養時間より短時間(26時間～29時間)で培養した場合に、薄いピンク色や灰色のコロニーが生育している場合は、最長の培養時間(30時間)まで培養を続けます。

薄いピンク色や灰色のコロニーが赤紫色に変化する場合があるからです。30時間の培養後に薄いピンク色や灰色のまま変化の無かったコロニーはリステリア菌ではありません。

フォームダム上には選択物質が無い場合、フォームダム上に生育したコロニーは測定しないで下さい。

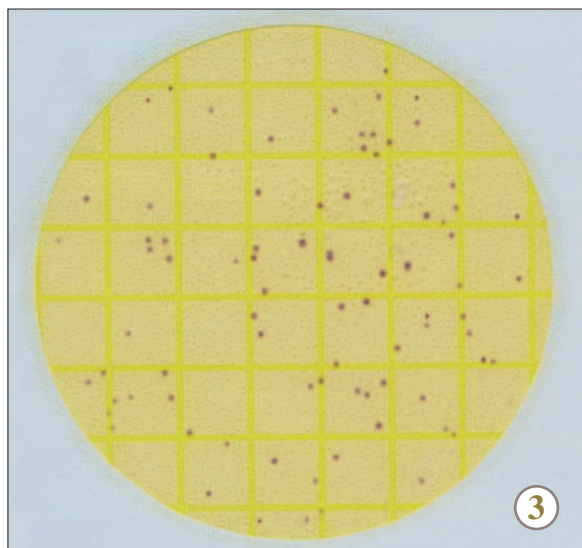


定性試験：リステリア菌陰性

概算試験：貴社の判断基準に従って、レベルを記録します。
(例: 低い、合格など)

定量試験：リステリア菌のコロニー数<1CFU

写真②は30時間培養後でコロニーの無い状態です。
検査は終了です。

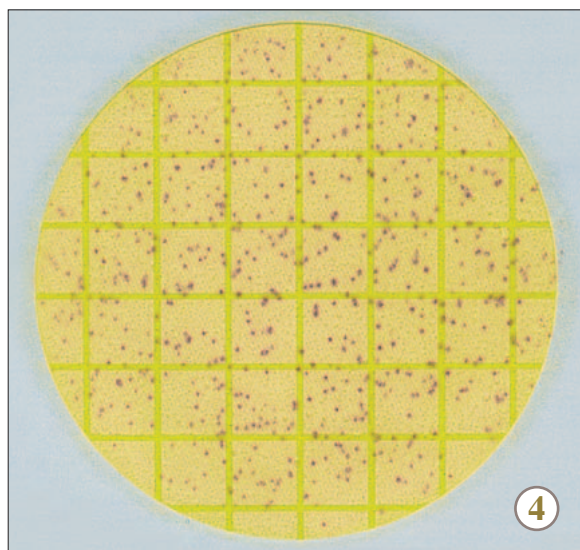


定性試験：リステリア菌陽性

概算試験：貴社の判断基準に従って、レベルを記録します。

定量試験：リステリア菌のコロニー数=84CFU

3M™ Petrifilm™ Environmental Listeria Plate



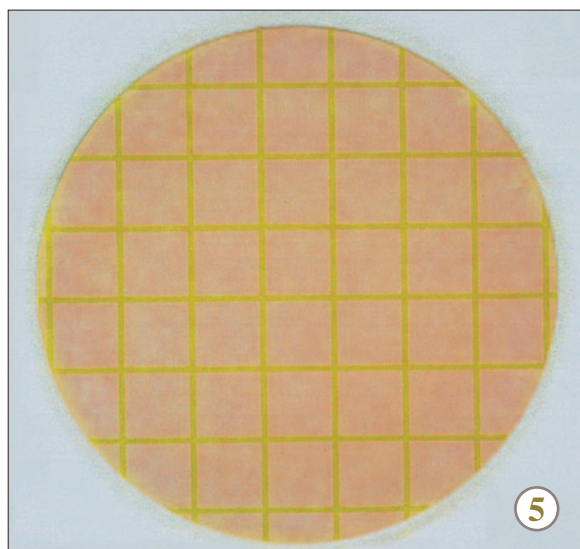
定性試験：リステリア菌陽性

概算試験：貴社の判断基準に従って、レベルを記録します。

定量試験：推定で 600 CFU

写真④の場合は2つ以上の升目のコロニー数を平均し42倍することで、推定コロニー数を計算します。

ELプレートの接種面積は42cm²です。

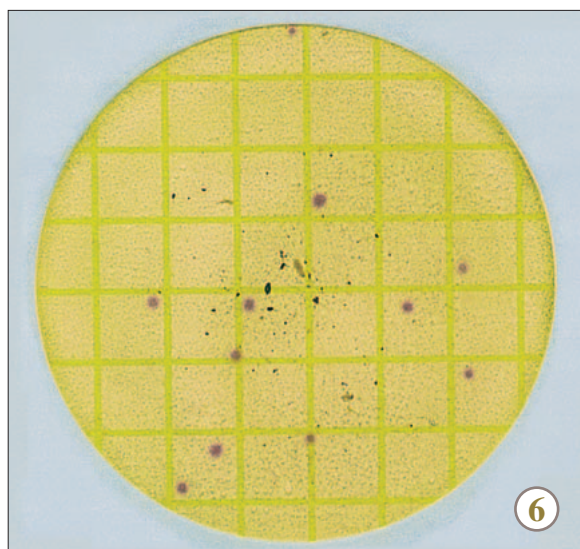


定性試験：リステリア菌陽性

概算試験：貴社の判断基準に従って、レベルを記録します。

定量試験：TNTC (測定不能多数) 約10⁴CFU

写真⑤は、測定不能多数のプレートです。プレート上にたくさんのコロニー見える場合や、全体が褐色がかったピンク色に変色する場合があります。



定性試験：リステリア菌陽性

概算試験：貴社の判断基準に従って、レベルを記録します。

定量試験：リステリア菌のコロニー数=11CFU

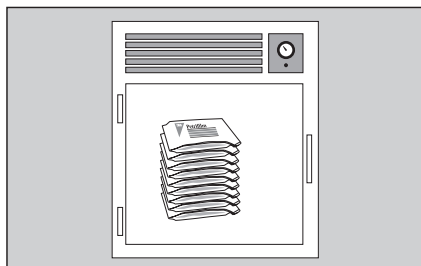
背景の色は検体の採取方法や、緩衝ペプトン水のメーカーの違いに左右されます。

赤紫色のコロニーをカウントしてください。

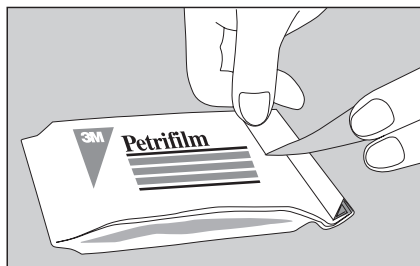
また、写真⑥には残渣も入っています。

使用手順概要

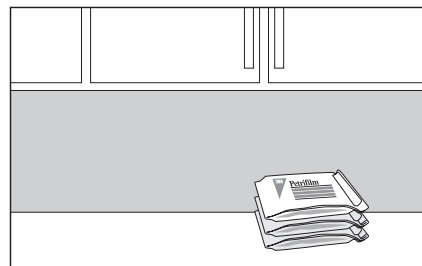
保管



- ① 未開封のペトリフィルム™プレートは、8℃以下で保管してください。ご使用の際には、開封前に製品を室温に戻してください。

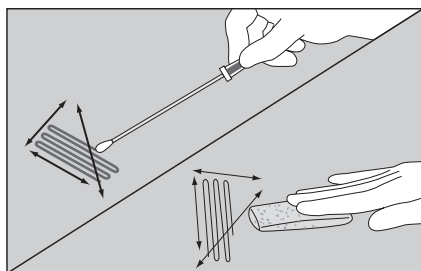


- ② 開封したパウチは開口部を折ってテープで封をして下さい。

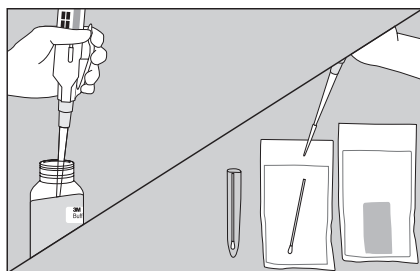


- ③ 開封後のパウチは25℃以下、相対湿度50%以下で保管して下さい。
一度開封したパウチを、再冷蔵しないで下さい。
開封後のプレートは一ヶ月以内に使用して下さい。

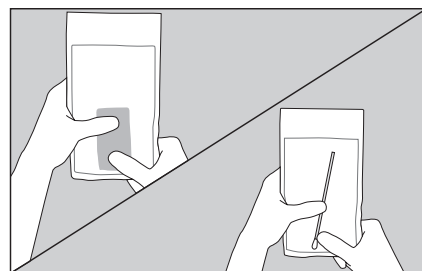
検体の調整



- ④ 10ml以下の希釈液で湿らせた綿棒やスポンジ等で、測定箇所の表面をよくふきとります。ふき取り器具は、滅菌水やリージョンプロスのような中和希釈液で湿らせます。

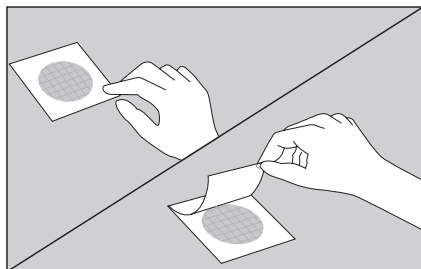


- ⑤ サンプルに滅菌緩衝ペプトン水 (BPW) を無菌的に5ml加えます。UVM、Fraser broth, LEB, BLEB等リステリア用培地は使用できません。

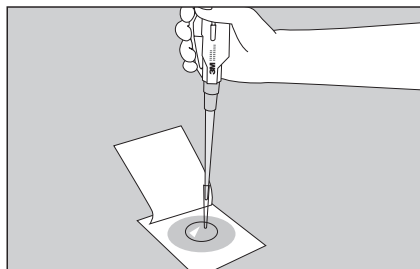


- ⑥ サンプルを約1分間混ぜて均質化します。
サンプルを室温 (20～30℃) で1時間から1.5時間放置します。1.5時間以上放置しないでください。この段階でリステリア菌の修復を行ないます。

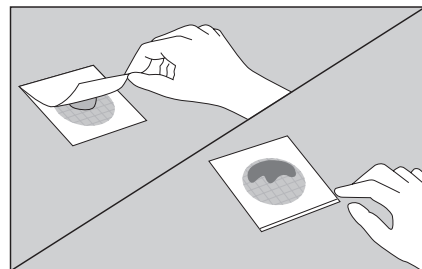
接種



- ⑦ ペトリフィルム™ELプレートを水平な台の上に置いて上部フィルムを持ち上げます。



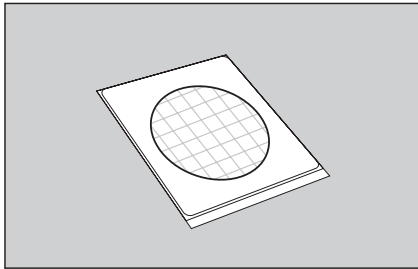
- ⑧ 検体を3ml下部フィルムの中央部に接種します。



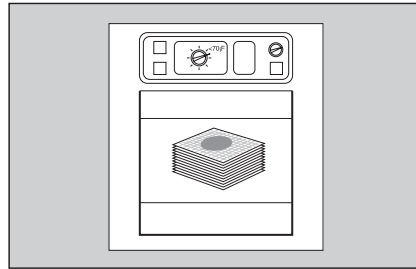
- ⑨ 上部フィルムを液面に沿わせ、気泡が混入しないようにかぶせます。

培養

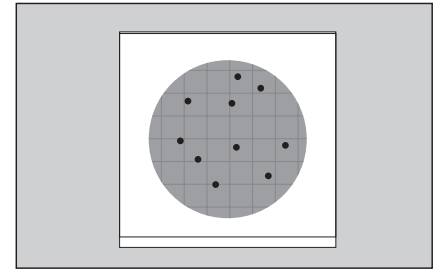
判定



- 10 ゲルが固化するまで少なくとも**10分間**放置します。



- 11 透明フィルム側を上にして培養してください。10枚まで重ねて培養することができます。35℃±1℃または37℃±1℃で**28時間±2時間**培養します。プレートの乾燥を最小限に押さえるような湿度を保って培養してください。

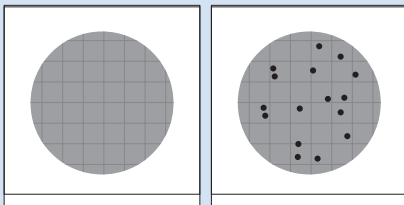


- 12 ペトリフィルムTMELプレートは通常のコロニーカウンターや、拡大鏡を用いて測定できます。フォームダム上には選択物質が無い場合、フォームダム上に生育したコロニーは測定しないでください。

ELプレートは定性試験、概算試験、定量試験の判定が可能です。

13 定性試験

色の濃淡にかかわらず赤紫色のコロニーが検出されたか（陽性）検出されなかったか（陰性）で結果を判定します。

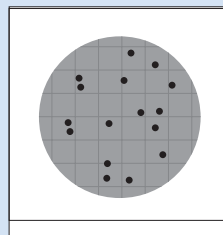


陰性

陽性

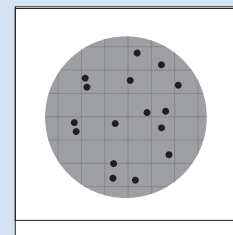
14 概算試験

色の濃淡にかかわらず、現れた赤紫色のコロニーが相対的に多数・中程度・少数、として結果を判定します。多数・中程度・少数という判定は、サンプルの場所や個々の工場の基準で判断します。



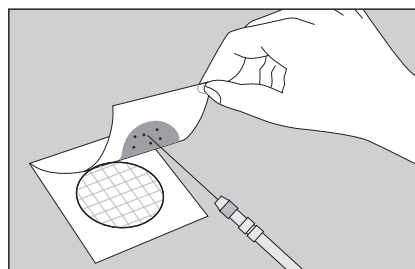
15 定量試験

色の濃淡にかかわらず全ての赤紫色のコロニーを数えてください。cm²当たりのコロニー数の計算方法については、このガイド内「定量試験の検査手順について」をよくお読みください。



釣菌

- 16 釣菌して同定試験を行なうことも可能です。上部フィルムから釣菌を行ないます。



定量試験の検査手順

定量検査を行なう場合には、下記の方法で面積あたりのコロニー数を計算します。

以下の点にもご注意ください。

- 検査方法の安定が環境検査から得られる情報の有用性の鍵となります。サンプルを採取する際には、いつも同じ方法で行ってください。可能であれば、同じ技術者が同じタイプの採取器具、定型の面積、同じ採取方法でサンプルを採取するようお勧めします。
- 採取する面積は公的規制、企業内の基準、もしくは、採取する場所などによって決定されますが、最終製品を製造するラインの採取面積は、より広く取ることをお勧めします。菌汚染のレベルが低いことが予想されるからです。
- 環境検査のサンプル採取方法については、下記の文献により詳しい情報があります。

- ◇ Standard Methods for the Examination of Dairy Products, Section 3.7D, American Public Health Association, Washington D.C., 1992
- ◇ Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, Section 3.512 and 3.521, American Public Health Association, Washington D.C., 2001

定量検査には以下の項目を記録する必要があります。

- サンプル採取場所の面積 (cm²)
- サンプル採取器具 (滅菌綿棒や滅菌綿など) を湿らせた希釈液の量 (ml)
- 加えた緩衝ペプトン水の量 (ml)
- プレートに接種した検体の量 (ml)
- 測定したコロニー数 (CFU)

以下の計算式か計算表に当てはめると面積あたりのコロニー数 (CFU／面積) を計算できます。

計算式

$$\text{CFU／面積} = (\text{測定したコロニー数} \times (\text{希釈液の量 (ml)} + \text{緩衝ペプトン水の量 (ml)}) \div 3\text{ml}) \div \text{採取場所の面積}$$

計算表

- A. 緩衝ペプトン水の量 + 希釈液の量
- B. プレートに滴下した量
- C. $A \div B$
- D. 測定したコロニー数
- E. $C \times D$
- F. 採取した面積
- G. $E \div F$

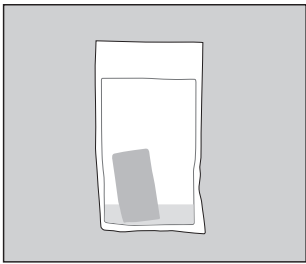
3

→ $G = \text{CFU／面積}$ となります。

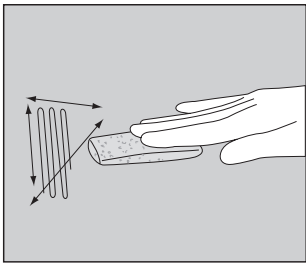
3M™ ペトリフィルム™ ELプレート

定量試験 計算例

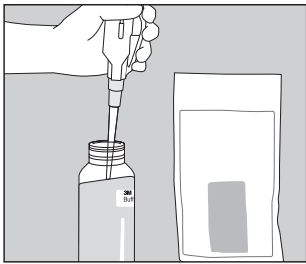
例：スポンジを用いた方法



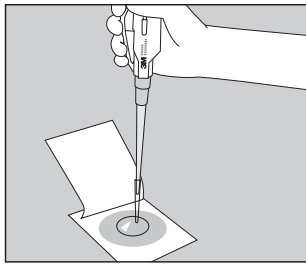
1 滅菌バックを用いて10mlの希釈液でスポンジを湿らせます。



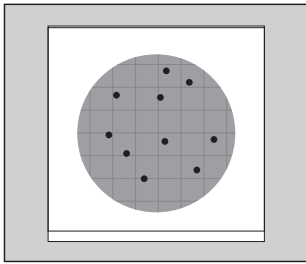
2 湿らせたスポンジで30cm四方をふき取ります。



3 スポンジを滅菌バックに戻し、5mlの緩衝ペプトン水を加え、約1分間混ぜます。



4 サンプルを室温（20～30℃）で1時間から1.5時間放置し、3mlをELプレートに接種します。

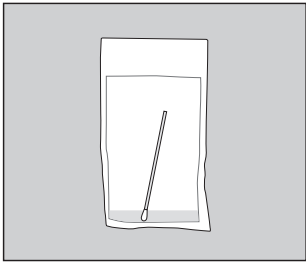


5 培養後コロニー数を測定します。（例として測定値を150コロニーとします。）

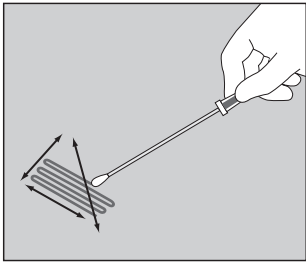
計算表

A. 緩衝ペプトン水の量+希釈液の量	5+10
B. プレートに滴下した量	3
C. $A \div B$	5
D. 測定したコロニー数	150
E. $C \times D$	750
F. 採取した面積	900
G. $E \div F$	0.8または1CFU/cm ²

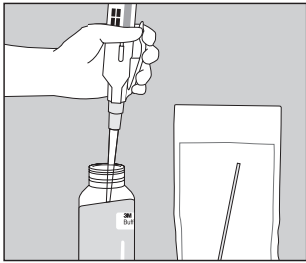
例：綿棒を用いた方法



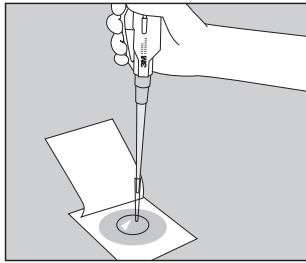
1 滅菌バック等を用いて1mlの希釈液で綿棒を湿らせます。



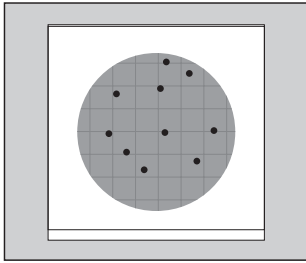
2 湿らせた綿棒で10cm四方をふき取ります。



3 綿棒を滅菌バックに戻し、5mlの緩衝ペプトン水を加え、約1分間混ぜます。



4 サンプルを室温（20～30℃）で1時間から1.5時間放置し、3mlをELプレートに接種します。



5 培養後コロニー数を測定します。（例として測定値を90コロニーとします。）

計算表

A. 緩衝ペプトン水の量+希釈液の量	5+1
B. プレートに滴下した量	3
C. $A \div B$	2
D. 測定したコロニー数	90
E. $C \times D$	180
F. 採取した面積	100
G. $E \div F$	1.8または2CFU/cm ²

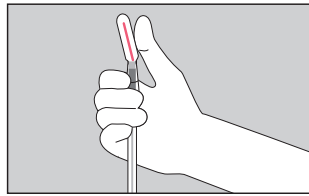
●ふき取り面積は、以下の資料を参考にしています。

COMPLIANCE GUIDELINES TO CONTROL *Listeria monocytogenes* IN POST-LETHALITY EXPOSED
READY-TO-EAT MEAT AND POULTRY PRODUCT, Food Safety and Inspection Service, Washington D.C.,2004

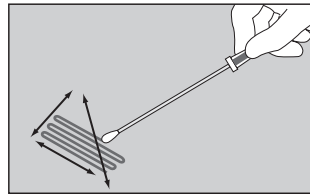
3M™ ペトリフィルム™ ELプレート 定量試験 計算例

例：クイックスワブを用いた方法

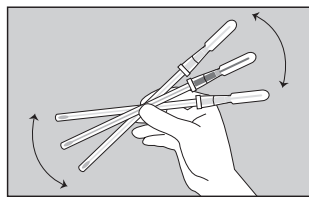
A 湿らせた状態でのふき取り



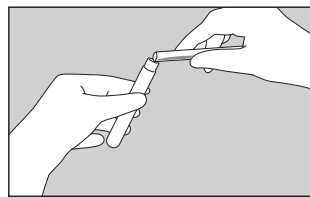
① クイックスワブの上部赤色スナップバルブを45度まで（またはパチンと音がするまで）曲げ、バルブを絞って下部チューブにリージンブロス全体を流しこみます。



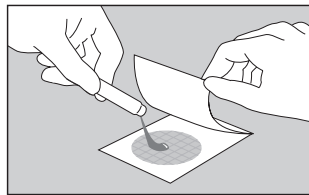
② 湿らせたスワブ部を取り出し、10cm四方をふき取ります。



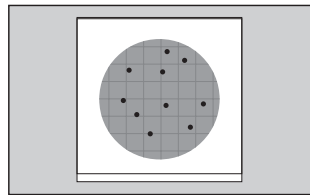
③ スワブ部をチューブに戻し、よく振ります。



④ 2mlの緩衝ペプトン水にふき取り溶液を全て加えます。

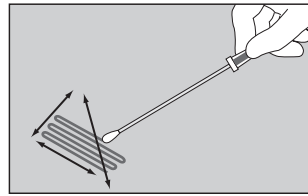


⑤ 溶液を室温（20～30℃）で1時間から1.5時間放置し、全ての溶液をELプレートに接種します。

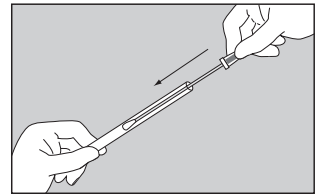


⑥ 培養後コロニー数を測定します。（例として測定値を100コロニーとします。）

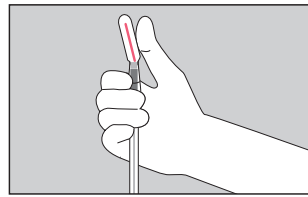
B 乾いた状態でのふき取り



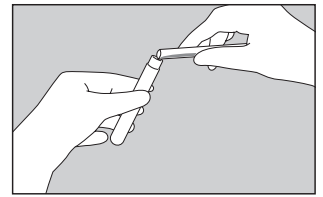
① クイックスワブのスワブ部を取り出し、10cm四方をふき取ります。



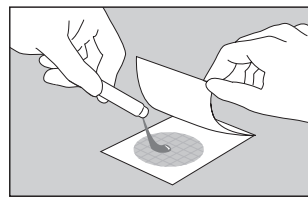
② スワブ部をチューブに戻します。



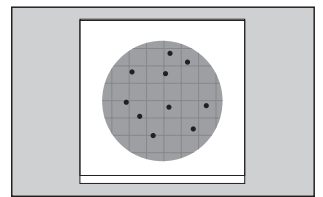
③ 上部赤色スナップバルブを45度まで（またはパチンと音がするまで）曲げ、バルブを絞って下部チューブにリージンブロス全体を流しこみ、よく振ります。



④ 2mlの緩衝ペプトン水にふき取り溶液を全て加えます。



⑤ 溶液を室温（20～30℃）で1時間から1.5時間放置し、全ての溶液をELプレートに接種します。



⑥ 培養後コロニー数を測定します。（例として測定値を100コロニーとします。）

計算表

- A. 緩衝ペプトン水の量+希釈液の量
B. プレートに滴下した量
C. $A \div B$
D. 測定したコロニー数
E. $C \times D$
F. 採取した面積
G. $E \div F$

A. 緩衝ペプトン水の量+希釈液の量	2+1
B. プレートに滴下した量	3
C. $A \div B$	1
D. 測定したコロニー数	100
E. $C \times D$	100
F. 採取した面積	100
G. $E \div F$	1 CFU/cm ²

● 注意事項、保証、保管などの詳細は製品に添付の製品取扱説明書を参照してください。

＜3M＞＜スリーエム＞＜Petrifilm＞＜ペトリフィルム＞は、3M社の商標です。



カスタマーコールセンター
製品についてのお問合せはナビダイヤルで
0570-011-321
市内通話料金でご利用いただけます。
受付時間 9:00～17:00（土・日・祝日・年末年始は除く）

ホームページ

<http://www.mmm.co.jp/hc/microbiology.html>

スリーエム ヘルスケア株式会社

医療用製品事業部 本社 〒158-8583 東京都世田谷区玉川台 2-33-1

人がいる。夢がある。 **3M**